

DESAIN PRIMER SPESIFIK GEN *tetB* (tetracycline resistance protein) BAKTERI

Bacillus subtilis

Didit Syaputra, *Rafika Sari, Pratiwi Apridamayanti

0858 2258 6891 – rafikasari.untan@gmail.com

Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura – Indonesia

ABSTRAK

Penyebab resistensi suatu bakteri terhadap antibiotik salah satunya adalah adanya gen resisten pada bakteri. Tetrasiklin merupakan salah satu antibiotik yang memiliki gen resisten pada suatu bakteri. Salah satu gen resisten pada antibiotik tetrasiklin adalah gen *tetB* yang mana terdapat di bakteri *Bacillus subtilis*. Pendeteksian adanya gen resisten pada instrumen PCR membutuhkan sebuah primer berupa sekuens DNA rantai pendek sebagai pengenalan DNA target secara spesifik. Desain primer dilakukan secara *insilico* menggunakan situs NCBI, Primer3Plus dan *OligoAnalyzer*. Sekuen nukleotida dari gen *tetB* *Bacillus subtilis* dapat dicari dalam situs NCBI dengan format FASTA yang dianalisis lebih lanjut menggunakan program Primer3Plus dan *OligoAnalyzer*. Hasil perancangan primer gen *tetB* *Bacillus subtilis* diperoleh 10 kandidat primer dengan menggunakan 2 perbedaan suhu optimum di program Primer3Plus yakni dari Tm optimum 55°C dan 60°C. Primer yang memiliki kriteria primer terbaik yakni primer 3 pada suhu 60°C dengan urutan basa primer *forward* 5'- ACCCTTTGCGGAGGACTAAT -3' dengan panjang basa 20, Tm 56,1°C, % GC sebesar 50 % , *hairpin* dengan nilai $\Delta G = -1,14$ kcal/mol, *self dimer* dengan nilai $\Delta G = -3,61$, serta *cross dimer* dengan nilai $\Delta G = -4,64$ kcal/mol dan urutan basa primer *reverse* yaitu 5' – CAAGGAACCTTTCCGATCAA -3' dengan panjang basa 20, Tm 52,7°C, % GC sebesar 45 % , *hairpin* dengan nilai $\Delta G = -1,41$ kcal/mol, *self dimer* dengan nilai $\Delta G = -6,61$ serta *cross dimer* dengan nilai $\Delta G = -3,9$ kcal/mol

Kata kunci: Desain primer, gen *tetB*, Tetrasiklin, *Bacillus subtilis*

PENDAHULUAN

Tetrasiklin ialah antibiotik yang umum digunakan sebagai obat-obatan veteriner dan diisolasi dari bakteri *Streptomyces sp.*⁽¹⁾ Tetrasiklin dapat berikatan dengan ribosom subunit 30S sehingga menghambat sintesis protein. Aktivitasnya dapat membunuh bakteri aerob dan anaerob seperti *spirochetes*, *mycoplasma*, *rickettsia* dan beberapa protozoa.⁽²⁾

Resistensi antibiotik adalah kemampuan dari bakteri atau mikroorganisme lain untuk menahan efek antibiotik.⁽³⁾ Penyebab adanya resisten pada antibiotik salah satunya adalah adanya gen resisten pada bakteri tertentu. Salah satu gen resisten pada antibiotik tetrasiklin adalah gen *tetB*.⁽⁵⁾ Penelitian Catherine L. Ives and Kenneth F. Bott telah menunjukkan bahwa plasmid *pCIS7*, yang mengandung DNA *Bacillus subtilis* diisolasi dari tetrasiklin-sensitif (Tc/s) strain, menghasilkan resisten ketika terintegrasi dan diperkuat dalam kromosom gen *B. Subtilis*.⁽⁵⁾ Hal ini juga diperkuat dengan penelitian Amano (1991) bahwa *B. subtilis* resisten terhadap antibiotik tetrasiklin secara genetik yang dibuktikan dengan adanya gen resistensi tetrasiklin *tetB*, pengkodean logam Tc / H + antiporter di wilayah genomik.⁽⁶⁾

Desain primer dapat dibuat dengan menggunakan konstruksi secara in siliko berbasis ilmu bioinformatika. Salah satu peran paling signifikan dari bioinformatika adalah untuk merancang dan menghasilkan sekuens primer.⁽⁷⁾ Hasil rancangan primer nantinya akan digunakan untuk mendiagnosa terkait kejadian resistensi pada pasien secara deteksi genetik suatu sampel, yakni dapat menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction (PCR)* sebagai penentu spesifitas amplifikasi gen yang sesuai dengan target yang akan dideteksi.^(8,9) Perancangan primer spesifik secara insiliko perlu dilakukan agar primer yang akan digunakan lebih spesifik dalam mendeteksi gen resisten *tetB* pada bakteri *Bacillus subtilis* sehingga pada proses di PCR dapat lebih efisien dan mengurangi biaya primer yang digunakan.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini adalah penelitian berbasis kajian biologi molekuler dan pengujian secara komputasi. Sekuens nukleotida dari sampel gen *tetB Bacillus subtilis* yang didapat dari situs *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, *Primer3Plus* dan *OligoAnalyzer 3.1*.

Pencarian Sekuens Nukleotida pada situs NCBI

Sekuens nukleotida gen *tetB* *Bacillus subtilis*. didapatkan dengan cara mencari pada *database National Center for Biotechnology Information* (NCBI) pada situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> menggunakan penelusuran di kotak pencaharian dengan kata kunci yaitu *tetB* *Bacillus subtilis*.

Pencarian Kandidat Primer dengan Primer3Plus

Sekuens nukleotida yang telah didapatkan di NCBI, disalin bagian “FASTA” dan dianalisis pemilihan kandidat primer *forward* dan *reverse* dengan menggunakan situs Primer3Plus, khususnya menggunakan alamat pada <http://primer3plus.com/cgibin/dev/primer3plus.cgi>. Hasil yang akan didapatkan yaitu 5 kandidat primer *forward* dan *reverse* dengan susunan basa nukleotida yang berbeda-beda.

Analisis Primer *Forward* dan *Reverse* dengan *OligoAnalyzer* 3.1

Hasil kandidat primer yang diperoleh kemudian dianalisa dengan mempertimbangkan kriteria primer di dalam program *Integrated DNA Technologies* (IDT) *OligoAnalyzer* 3.1 dengan menempelkan urutan primer ke dalam kotak urutan dan klik pada kotak

Analyze, Hairpin: *Cross-Dimer* dan *Self-Dimer*.

Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini merupakan data primer, yaitu data yang diperoleh peneliti langsung dari hasil analisis kandidat primer menggunakan situs Primer3Plus. Kandidat primer yang dihasilkan tersebut kemudian dianalisis struktur sekunder dan sifat lainnya menggunakan perangkat *OligoAnalyzer*. Perangkat ini menampilkan sifat-sifat seperti nilai *hairpin*, % GC, panjang basa, *melting temperature* (T_m), *self dimer* dan *cross dimer*. Data yang dihasilkan merupakan data yang bersifat kualitatif, sehingga hanya dilakukan analisis deskriptif

HASIL DAN DISKUSI

Pencarian Sekuen Nukleotida Gen *tetB* *Bacillus subtilis* pada situs NCBI

Data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu data urutan basa nukleotida yang didapatkan dari menu pencarian Refseqgene guna mengarahkan pencarian dari data yang berbasis genetika secara umum dari organisme. Pencarian data sekuen gen *tetB* bakteri *Bacillus subtilis* menggunakan kata kunci “tetB *Bacillus subtilis*” sehingga di dapatkan hasil gen spesifik dari gen *tetB* bakteri *Bacillus subtilis* yang dapat di akses pada alamat situs

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/937890>

dengan kode Gene ID yakni 937890. Hasil pencarian melalui NCBI diidentifikasi terlebih dahulu pada bagian *summary* yang berisi rincian singkat mengenai identitas gen yang telah didapat, sehingga gen yang akan digunakan pada perancangan primer sesuai dengan gen yang diinginkan yaitu gen *tetB* *Bacillus subtilis*. (**Gambar 1**). Hasil yang didapat bahwa data gen memiliki simbol gen yakni “*tetB*” dengan deskripsi gen tersebut adalah *multifunctional tetracycline-metal/H+ antiporter and Na+(K+)/H+ antiporter*, di mana lokus genetiknya terletak pada BSU_40770.

tetB multifunctional tetracycline-metal/H+ antiporter and Na+(K+)/H+ antiporter [*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168]

Gene ID: 937890, updated on 18-Sep-2018

Summary	
Gene symbol	tetB
Gene description	multifunctional tetracycline-metal/H+ antiporter and Na+(K+)/H+ antiporter
Locus tag	BSU_40770
Gene type	protein coding
RefSeq status	PROVISIONAL
Organism	Bacillus subtilis subsp. <i>subtilis</i> str. 168 (strain: 168, sub-species: <i>subtilis</i>)
Lineage	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus
Old locus tag	BSU40770

Gambar 1. Ringkasan Informasi gen *tetB* *Bacillus subtilis*

Identifikasi pada data sekuen nukleotida gen *tetB* *Bacillus subtilis*, khususnya pada data *GenBank* menunjukkan

bahwa sekuen terdiri dari 1377 pasang basa dengan DNA jenis linear dengan *Coding DNA Sequens* (CDS). Pada sekuen ini

terletak pada seluruh basa nukleotida, di mana CDS merupakan bagian sekuen yang berperan penting dalam ekspresi gen untuk pembentukan protein⁽¹⁰⁾. Hal tersebut

menjadi hal yang potensial untuk didapatkan perancangan primernya, terlihat dari data origin sekuen nukleotida dari gen *tetB* *Bacillus subtilis* (**Gambar 2**).

```

ORIGIN
  1 gtgaatacgt cttattcaca gtcaacttta cggcacaatc aagttttgat ttggctttgt
 61 gttctatcat ttttcagcgt attaaatgaa atggttctga acgtctcatt acctgatatt
121 gccaacgagt ttaataaact gccagcaagt gcaaaactggg tgaatacagc ctttatgtta
181 accttctcca ttggaacagc tctatatgga aagctatcag accagctggg catcaaaaat
241 ctgcttctat ttgggattat ggtaaatggc ttagggctga tcattggatt tgttggacac
301 tctttctttc ctatttctcat tctagcccga tttattcaag gaattgggtgc agccgcattc
361 ccagctcttg tgatggttgt cgttgcgcgc tatattccaa aagagaacag ggggaaagca
421 ttggccctga tcgggtccct ggtagcaatg ggagaagggtg ttgggccagc tattggcggaa
481 atggttgctc attatatcca ttggtcgtat ttgctgctta ttccaactgc aacaattatc
541 accgttccat tccttataaa attggtgaaa aaggaaagaga gaataagagg acacattgat
601 atggcaggga ttatatgtat gtctgcaggt atcgtatttt ttatgctgtt tacaacatct
661 tatagatttt cttttctgat catcagtatc cttgctttct tcatatttgt gcaacacatt
721 aggaaagctc aggacccttt tgttgaccct gaattaggga aaaacgtctt ttttgtgatt
781 ggaacccttt gcggaggact aatatttggt acagtagcag gatttgtctc tatggttctc
841 tacatgatga aagatgttca ccatttaagt actgcagcaa ttggaagcgg cattattttc
901 ccggaacaa tgagtgtcat catctttggt tacattgggg gattgcttgt tgatcggaaa
961 ggttccttgt atgtactaac tattggaagt gcattgcttt cttccggctt tttaatcgct
1021 gcccttttta tagatgcagc accatggatc atgacaatta tagtaatttt tgttttggg
1081 gggctatctt tcacaaaaac agttatatct acagttgtgt ctgacagttt gaaagaaaaa
1141 gaagcggcgc ctggaatgag ttgcttaaat ttcacgagct tttatcaga gggaaacgggt
1201 attgcgattg taggcggttt attatctatc ggcttcctag atcataggct gctgcctatt
1261 gacgttgatc actctaccta ttgtatagc aatatgctca tactttttgc aggaatcatt
1321 gttatttggt ggctagtaat ctggaatgta tataaacgtt cgcggagaca tggctaa
//

```

Gambar 2. Basa Nukleotida dari gen *tetB* *Bacillus subtilis*

Perancangan Kandidat Primer dengan Menggunakan Primer3Plus

Primer3Plus tidak hanya digunakan untuk mencari kandidat primer, tetapi dapat digunakan untuk menganalisis kriteria primer, namun kriteria primer yang terdapat pada situs ini hanya panjang basa, Tm dan % GC, sehingga perlu dilakukan analisis lebih lanjut dengan program atau situs lain. Sekuen nukleotida yang telah didapatkan khususnya pada format FASTA, kemudian disalin konten sekuen nukleotidanya pada kolom utama Primer3plus. Setelah sekuen

tersebut terisi pada kolom utama kemudian dilanjutkan pada proses analisa kandidat primer dengan memilih opsi “*Pick Primers*”.

Suhu yang digunakan pada penelitian ini adalah suhu optimal. Pada analisis menggunakan suhu optimal sebesar 55°C, hasil yang didapatkan khususnya pada kriteria Tm tidak masuk dalam rentang primer yang baik yakni 52 - 58°C⁽¹²⁾, sehingga pada bagian sub menu di Primer3Plus khususnya di *General Settings* dapat diatur menggunakan suhu optimal sebesar 60°C.. Primer yang didapatkan

melalui situs ini secara otomatis terdapat 10 kandidat primer dengan masing-masing 5 primer *forward* dan 5 primer *reverse*, serta

panjang produk yang berbeda. Pada **Tabel 1** menggunakan suhu 55°C dan **Tabel 2** menggunakan Suhu 60°C.

Tabel 1. Data Kandidat Primer gen *tetB Bacillus subtilis* Suhu 55°C

Kandidat Primer	Primer Forward	Primer Reverse	Panjang Produk
Primer 1	ATGAAATGGTTCTGAACGTC	CCATTTACCATAATCCCAAA	184 bp
Primer 2	GCGCTATATTCCAAAAGAGA	GCCATATCAATGTGTCCTCT	219 bp
Primer 3	AGTCAACTTTACGGCACAAT	CCATTTACCATAATCCCAAA	250 bp
Primer 4	ATGAAATGGTTCTGAACGTC	TAAATCGGGCTAGAATGAGA	249 bp
Primer 5	ATGAAATGGTTCTGAACGTC	GAGTGTCCAACAAATCCAAT	217 bp

Tabel 2. Data Kandidat Primer gen *tetB Bacillus subtilis* Suhu 60°C

Kandidat Primer	Primer Forward	Primer Reverse	Panjang Produk
Primer 1	TGCTTTCTTCCGGCTTTTTA	ACCGCCTACAATCGCAATAC	224 bp
Primer 2	ACCCTTTGCGGAGGACTAAT	TAAAAAGCCGGAAGAAAGCA	231 bp
Primer 3	ACCCTTTGCGGAGGACTAAT	CAAGGAACCTTTCCGATCAA	186 bp
Primer 4	GCTTAGGGTCGATCATTGGA	AAATGCTTTCCCCCTGTTCT	155 bp
Primer 5	GACCCTTTTGTTGACCCTGA	GAAAATAATGCCGCTTCCAA	168 bp

Analisa Primer gen *tetB Bacillus subtilis* dengan menggunakan *OligoAnalyzer*

Hasil yang didapatkan setelah analisis kandidat primer pada OligoAnalyzer 3.1, semua kandidat primer memiliki nilai yang sama yaitu terdiri dari 20 basa

nukleotida. Berdasarkan analisis kriteria primer gen *tetB Bacillus subtilis* (**Tabel 3 & Tabel 4**), primer yang telah dianalisis dari kandidat primer 1 sampai dengan kandidat primer 5 baik *forward* maupun *reverse*, telah memenuhi kriteria primer karena masuk ke

dalam rentang panjang basa 18-30 nukleotida.⁽¹¹⁾

T_m yang optimal untuk suatu primer berkisar antara 52°-58°C.⁽¹³⁾ Berdasarkan dari **Tabel 3**, hasil yang diperoleh dari kandidat primer 1 hingga kandidat primer 5 pada suhu 55°C menunjukkan dibawah dari T_m optimal untuk suatu primer yang mana dibawah 52°C, sehingga primer tersebut tidak dapat digunakan dalam suatu proses PCR. Sedangkan pada kandidat primer di suhu 60°C di **Tabel 4** menunjukkan bahwa kandidat primer 1, 2, 3 dan 4 termasuk primer yang sesuai dengan T_m optimal. Pada kandidat primer 5 tidak termasuk dalam rentang T_m optimal yakni dibawah 52°C pada primer *Reverse*, sedangkan primer *Forward* pada kandidat primer 5 masuk dalam rentang T_m optimal.

Persentase G dan C atau % GC merupakan persentase jumlah basa guanin dan sitosin yang terdapat dalam suatu primer. %GC yang diperoleh dari hasil analisis sudah sesuai dengan syarat dari kriteria primer yang ditetapkan yaitu 40-60%.⁽¹²⁾ Berdasarkan dari **Tabel 3**, primer 1 dan primer 3 pada bagian *Reverse* suhu A yaitu 35%, sehingga tidak termasuk syarat dari kriteria %GC. Pada kandidat primer lainnya pada suhu A menunjukkan %GC yang sesuai dengan syarat kriteria primer.

%GC untuk kandidat primer menggunakan suhu B telah sesuai dengan syarat, baik dari kandidat primer 1 hingga kandidat primer 5 untuk *Forward* dan *Reverse*.

Tabel 3. Hasil Analisis Panjang Basa, T_m dan %GC menggunakan suhu 55°C

Kandidat Primer	Panjang Basa	T _m	%GC
Forward 1	20	50,6	40%
Reverse 1	20	47,7	35%
Forward 2	20	50	40%
Reverse 2	20	52,1	45%
Forward 3	20	52,3	40%
Reverse 3	20	47,7	35%
Forward 4	20	50,6	40%
Reverse 4	20	50,3	40%
Forward 5	20	50,6	40%
Reverse 5	20	50,7	40%

Tabel 4. Hasil Analisis Panjang basa, T_m dan %GC menggunakan suhu 60°C

Kandidat Primer	Panjang Basa	T _m	%GC
Forward 1	20	52,6	40%
Reverse 1	20	55,3	50%
Forward 2	20	56,1	50%
Reverse 2	20	52,6	40%
Forward 3	20	56,1	50%
Reverse 3	20	52,7	45%
Forward 4	20	54,3	50%
Reverse 4	20	54,6	45%
Forward 5	20	55	50%
Reverse 5	20	51,6	40%

Keterangan: Data yang di *highlight* tidak memenuhi kriteria primer.

Berdasarkan dari **Tabel 4&5**, semua kandidat primer baik pada suhu 55°C dan suhu 60°C dapat dengan mudah memecah struktur *hairpin* yang terbentuk, karena semua kandidat primer memiliki nilai ΔG lebih besar dari -3 kcal/mol. Parameter pada *self dimer* dilihat dari nilai ΔG atau energi bebas. Nilai ΔG yang diperlukan untuk suatu primer memecah struktur *self dimer* yaitu memiliki nilai ΔG lebih besar dari -6 kcal/mol. pada kandidat Analisis *Cross dimer*, dianalisis dengan menghitung energi bebas ikatan antara primer *forward* dan *reverse*, sehingga dapat memprediksi terjadinya struktur sekunder antara primer forward dan reverse. Ikatan ini dapat diputus apabila suatu primer memiliki nilai ΔG lebih besar dari -6 kcal/mol.

Hasil analisis menunjukkan bahwa kandidat primer pada suhu 55°C terdapat 3 primer *reverse* yang tidak sesuai dengan kriteria *Cross dimer* yang diinginkan yakni primer *reverse* 1,3 dan 5 dengan nilai berturut-turut -6,5 kcal/mol, -6,5 kcal/mol dan -8,54 kcal/mol. Pada kandidat primer suhu 60°C terdapat 5 kandidat primer yang tidak sesuai dengan kriteria *Cross dimer* yang diinginkan yakni primer 1 *forward*, primer 1 *reverse*, primer 2 *reverse*, primer 4 *reverse* dan primer 5 *forward* dengan nilai berturut-turut -8,68 kcal/mol, -6,75

kcal/mol, -8,63 kcal/mol, -9,21 kcal/mol, dan -10,65 kcal/mol. (**Tabel 4&5**).

Tabel 4. Hasil Analisis *Hairpins*, *Self Dimer* dan *Cross Dimer* menggunakan suhu 55°C

Kandidat Primer	<i>Hairpin</i> (kcal/mol)	<i>Self Dimer</i> (kcal/mol)	<i>Cross Dimer</i> (kcal/mol)
Forward 1	-0,53	-6,3	-5,47
Reverse 1	1,57	-3,89	-6,5
Forward 2	0,72	-9,89	-3,89
Reverse 2	-0,36	-3,91	-3,3
Forward 3	1,1	-3,61	-3,9
Reverse 3	1,57	-3,89	-6,5
Forward 4	-0,53	-6,3	-5,47
Reverse 4	0,54	-4,16	-3,42
Forward 5	-0,53	-6,3	-5,47
Reverse 5	-0,25	-3,3	-8,54

Tabel 4. Hasil Analisis *Hairpins*, *Self Dimer* dan *Cross Dimer* menggunakan suhu 55°C

Kandidat Primer	<i>Hairpin</i> (kcal/mol)	<i>Self Dimer</i> (kcal/mol)	<i>Cross Dimer</i> (kcal/mol)
Forward 1	-0,31	-3,14	-8,68
Reverse 1	0,22	-3,61	-6,75
Forward 2	-1,14	-3,61	-4,64
Reverse 2	-0,32	-9,75	-8,63
Forward 3	-1,14	-3,61	-4,64
Reverse 3	-1,41	-6,61	-3,9
Forward 4	0,85	-4,62	-3,07
Reverse 4	1,31	-3,89	-9,21
Forward 5	1,35	-1,34	-10,65
Reverse 5	1,49	-3,61	-3,89

Keterangan: Data yang di *highlight* tidak memenuhi kriteria primer.

Kriteria Primer Terbaik dari Gen *tetB* *Bacillus subtilis*

Hasil analisis kriteria primer dari gen *tetB Bacillus subtilis* yang meliputi panjang basa, Tm, % GC, *hairpin*, *self dimer* dan *cross dimer* menunjukkan bahwa pasangan kandidat primer 3 pada suhu 60° telah memenuhi kriteria primer, sehingga dapat dikatakan sebagai primer yang terbaik. Kandidat primer 3 pada suhu 60°C memiliki ukuran 20 panjang basa untuk primer *forward* dengan urutan ACCCTTTGCGGAGGACTAAT, dan untuk primer *reverse* memiliki ukuran 20 panjang basa dengan urutan basa CAAGGAACCTTTCCGATCAA. Hal ini menandakan bahwa kandidat primer 3 suhu

B telah memenuhi dari kriteria dalam hal panjang basa.

Hasil analisis menunjukkan kandidat primer 3 pada suhu 60°C didapatkan nilai Tm sebesar 56,1°C untuk primer *forward* sedangkan 52,7°C untuk primer *reverse*. Hal ini menandakan bahwa kandidat primer 3 pada suhu 60°C telah memenuhi kriteria primer karena nilai Tm yang didapatkan berada pada rentang Tm yang optimal .

% GC yang diperoleh untuk kandidat primer 3 pada suhu 60°C yaitu 50% untuk primer *forward* dan 45% untuk primer *reverse*. Hal ini menandakan bahwa kandidat primer 3 pada suhu 60°C telah memenuhi kriteria primer dari % GC karena berada pada rentang 40-60%.

Tabel 6. Primer 3 Pada Suhu 60°C dengan Primer terbaik gen *tetB Bacillus subtilis*

Primer	Panjang Basa	Tm	%GC	<i>Hairpin</i> (kcal/mol)	Self Dimer (kcal/mol)	Cross Dimer (kcal/mol)
<i>Forward</i>	20	56,1°C	50%	-1,14	-3,61	-4,64
<i>Reverse</i>	20	52,7°C	45%	-1,41	-6,61	-3,9

Nilai ΔG yang diperoleh kandidat primer 3 pada suhu 60°C untuk kriteria *hairpin* yaitu sebesar -1,14 kcal/mol untuk primer *forward*, sedangkan untuk primer *reverse* sebesar -1,41 kcal/mol. Hal ini menandakan bahwa kandidat primer 3 pada suhu 60°C dapat dengan mudah memecah struktur *hairpin* yang terbentuk karena memiliki nilai ΔG yang lebih besar dari -3 kcal/mol. Nilai ΔG yang diperoleh kandidat primer 3 suhu 60°C pada kriteria *self dimer* yaitu sebesar -3,61 kcal/mol untuk primer *forward* dan -6,61 kcal/mol untuk primer *reverse*, sedangkan pada kriteria *cross dimer* nilai ΔG yang didapatkan yaitu sebesar -4,64 kcal/mol untuk primer *forward* dan -3,9 kcal/mol untuk primer *reverse*.

Hal ini menandakan bahwa kandidat primer 3 suhu 60°C pada primer *reverse* seharusnya memiliki *self dimer* yang sulit untuk diputus karena memiliki nilai ΔG sebesar -6,61 kcal/mol yang mana tidak jauh dari -6 kcal/mol dan hanya berpengaruh pada primer *reverse*, namun pada primer 4 pada suhu 60°C di bagian *reverse* menunjukkan nilai *Cross dimer* sebesar -9,21 kcal/mol, sehingga akan sulit memecah dimer untuk primer *forward* maupun *reverse*. sehingga primer 3 suhu 60°C lebih memenuhi sebagai primer terbaik.

KESIMPULAN

Hasil perancangan didapat bahwa primer 3 pada suhu 60°C gen *tetB Bacillus subtilis* memiliki kriteria primer yang dengan urutan basa primer *forward* ACCCTTTGCGGAGGACTAAT dan primer *reverse* CAAGGAACCTTTCCGATCAA, panjang basa 20 nukleotida, nilai T_m 56,1°C dan 52,7°C, % GC sebesar 50% dan 45%, *hairpin* dengan nilai ΔG = -1,14 dan -1,41 kcal/mol, *self dimer* dengan nilai ΔG = -3,61 dan -6,61 kcal/mol, serta *cross dimer* dengan nilai ΔG = -4,64 dan -3,9 kcal/mol, sehingga primer dapat digunakan sebagai primer spesifik untuk mendeteksi resistensi antibiotik tetrasiklin dengan menggunakan PCR.

REFERENSI

1. Yuningsih. Keberadaan residu antibiotika dalam produk peternakan (susu dan daging). Di Dalam: Lokakarya Nasional Keamanan Pangan Produk Peternakan. Bogor: Balai Penelitian Veteriner; 2004: Hlm 48 -55.
2. Siswandono, Soekardjo B. Hubungan Struktur Aktivitas Obat Antibiotika: Kimia Medisinal; 2008

3. Betina V. The chemistry and biology of antibiotics. New York: Scientific Publishing Company; 1983.
4. Earl, A. M., Losick, R., & Kolter, R. *Bacillus subtilis* Genome Diversity 189(3), 1163–1170.2007
5. Ives CL, Bott KF, Analysis of the *tet* gene of plasmid isolated from *Bacillus subtilis*, Elsevier Science Publisher, USA, 1990
6. Amano, H., Ives, C. L., Bott, K. F. & Shishido, K. A limited number of *Bacillus subtilis* strains carry a tetracycline-resistance determinant at a site close to the origin of replication. *Biochim Biophys Acta* 1088,1991, 251–258.
7. Sasmito DEK, Kurniawan R, Muhimmah I. Karakteristik primer pada polymerase chain raction (PCR) untuk sekuensing DNA: mini review. *SNIMed V* 2014. 2014 Des: 93-102.
8. Gueimonde M, Sánchez B, Clara G. de los Reyes-Gavilán and Margolles A. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers In Microbiology* 2013;4(202):1-6.
9. Rahman MT, Uddin MS, Sultana R, Moue A, Setu M. Polymerase chain reaction (PCR): a short review. *AKMMC J* 2013;4(1):30-36.
10. Kitts PA et al. Assembly: a resource for assembled genomes at NCBI. *Nucleic Acids Res.* 2016: (44); 73 – 80.
11. Innis MA, Gelfand DH. *PCR Protocol: A Guide to Methods and Applications*. New York: Academic Press; 1990. Hal 3-12.
12. Borah P. Primer Designing for PCR. *Science Vision.* 2011; 11(3): 134-136.